

XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG GÂY BỆNH PHÂN TRẮNG CỦA VI KHUẨN *Vibrio* spp. PHÂN LẬP TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trương Minh Út¹, Lê Minh Khôi², Nguyễn Trọng Nghĩa³,
Lý Thị Ngọc Duyên², Từ Thanh Dung²

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định khả năng gây bệnh phân trắng của 4 loài vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* (A), *V. cholerae* (C), *V. vulnificus* (V) và *V. parahaemolyticus* (P) được phân lập từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm đơn loài xác định nồng độ gây chết 50% (LD₅₀) của *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus* lần lượt là $1,5 \times 10^4$ CFU/mL và $2,7 \times 10^5$ CFU/mL. Tỷ lệ chết của tôm trong thí nghiệm cảm nhiễm với tổ hợp *Vibrio* spp. được ghi nhận theo thứ tự ACVP < ACP < ACV < AVP < AVP ở tất cả các nồng độ cảm nhiễm. Đặc biệt, ở thí nghiệm cảm nhiễm với tổ hợp vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* (ACV) và *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* (ACP) tôm biểu hiện dấu hiệu bệnh lý đường ruột có phân lỏng và màu trắng sữa đặc trưng tương tự như tôm thẻ chân trắng bị bệnh phân trắng thu từ ao nuôi ngoài tự nhiên.

Từ khóa: Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), vi khuẩn *Vibrio* spp., bệnh phân trắng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với một số bệnh như đốm trắng, hoại tử gan tụy cấp tính/Hội chứng chết sớm, bệnh chậm lớn do vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei*, bệnh phân trắng (White Feces Disease WFD) được xem là một trong những bệnh nguy hiểm xảy ra phổ biến và gây thiệt hại đối với nghề nuôi tôm nước ta trong những năm gần đây (Tổng cục Thủy sản, 2021). Bệnh đặc trưng bởi các dấu hiệu như phân lỏng, đường ruột có màu vàng nâu và chuyển dần sang màu trắng sữa (Poh Yong Thong, 2016). WFD thuộc nhóm bệnh chưa rõ nguyên nhân với sự xuất hiện của nhiều nhóm tác nhân khác nhau trên tôm nhiễm bệnh bao gồm virus MBV và HPV (Nguyễn Thị Thu Hà và ctv., 2011), nhóm kí sinh trùng như trùng hai tế bào Gregrarine và vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) (Tang et al., 2016; Nguyễn Thị Thu Hà và ctv., 2011), thực thể Vermiform (Sriurairatana et al., 2014) và vi khuẩn *Vibrio* spp. Vi khuẩn *Vibrio* spp. là tác nhân thường gặp với tỉ lệ nhiễm trên 40% trên tôm nhiễm bệnh phân trắng với một số loài phổ biến được phân lập như *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus* và *V. cholerae* (Truong et al., 2021; Kumara and Hettiarachchi, 2017; Cao et al., 2015; Limsuwan, 2010).

Với diễn biến phức tạp và sự ảnh hưởng của bệnh phân trắng hiện nay, việc xác định được tác nhân gây bệnh là vô cùng cấp thiết. Các giả thuyết về vai trò khởi phát và khả năng gây bệnh phân trắng của vi khuẩn *Vibrio* spp. cũng đã được công bố trong một vài nghiên cứu (Poh Yong Thong, 2016; Cao et al., 2015; Kumara and Hettiarachchi, 2017), tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về khả năng gây bệnh phân trắng của vi khuẩn *Vibrio* spp. tại Việt Nam. Do đó, để cung cấp thêm thông tin khoa học về khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Vibrio* spp. lên tôm thẻ chân trắng ở nước ta, làm cơ sở cho việc nghiên cứu ứng dụng các biện pháp phòng và trị bệnh hiệu quả nên nghiên cứu “Xác định khả năng gây bệnh phân trắng của vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long” được thực hiện. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về khả năng gây bệnh phân trắng của *Vibrio* spp. phân lập từ tôm thẻ chân trắng tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. được chọn từ bộ sưu tập vi khuẩn phân lập

¹ Nghiên cứu sinh khóa 2016, Khoa Thủy sản (CAF), Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Thủy sản (CAF), Trường Đại học Cần Thơ

³ Công ty TNHH Một thành viên APC

* Tác giả chính: E-mail: truongut2006cm@yahoo.com

từ tôm thẻ chân trắng bệnh phân trắng nuôi thâm canh tại các tỉnh ven biển Đồng bằng sông Cửu Long (Cà Mau, Bến Tre, Sóc Trăng) trong nghiên cứu của Truong và cộng tác viên (2021), được lưu trữ tại Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ.

Nguồn tôm thí nghiệm: Tôm thẻ chân trắng sạch bệnh, trọng lượng 10 - 12 gram, sản xuất từ Bộ môn Kỹ thuật nuôi Hải sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị vi khuẩn cảm nhiễm

Các chủng vi khuẩn được phục hồi trên môi trường Tryptic Soy Agar có bổ sung 1,5% NaCl (TSA⁺) và Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS), ủ 28°C trong 24 giờ sau đó quan sát màu sắc, hình dạng khuẩn lạc và nhuộm Gram để xác định tính thuần của vi khuẩn. Vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion Broth có bổ sung 1,5% NaCl, trong 24 giờ, ly tâm ở 4.500 rpm, rửa 2 lần bằng nước muối sinh lý tiệt trùng 0,85% và xác định mật độ bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm ($OD = 1 \pm 0,02$) để đạt mật độ tương đương với 10^9 CFU/mL kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường TCBS. Dung dịch huyền phù vi khuẩn sau đó được pha loãng với NaCl 0,85% giảm dần theo tỉ lệ 1 : 9 để được dãy nồng độ sử dụng trong thí nghiệm cảm nhiễm.

2.2.2. Thí nghiệm xác định độc lực vi khuẩn *Vibrio* spp. đơn loài

Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên 4 thí nghiệm tương ứng với 4 chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. Mỗi thí nghiệm được bố trí gồm 5 nghiệm thức, lặp lại 3 lần, bao gồm 1 nghiệm thức đối chứng (không cảm nhiễm) và 4 nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn ở dãy nồng độ từ 0,78; 0,97; 0,7 và $0,39 \times 10^3 - 10^6$ CFU/mL tương ứng với từng chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* CM3IC1, *V. cholera* CM3HPTB1, *V. vulnificus* CM2HPA4 và *V. parahaemolyticus* BTIA1. Tôm được bố trí trong hệ thống bể nhựa 80 lít, số lượng 20 con/bể và được gây cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm 0,1 mL vào trong xoang gan tụy và tim.

Theo dõi thí nghiệm: Các nghiệm thức được ghi nhận tỉ lệ chết liên tục cho đến 14 ngày sau cảm nhiễm. Dấu hiệu bệnh lý của tôm cảm nhiễm và các chỉ tiêu chất lượng nước cũng được theo dõi mỗi ngày. Xác định giá trị LD_{50} theo phương pháp của Reed and Muench (1938) để biết khả năng

gây bệnh của vi khuẩn và so sánh độc lực giữa các chủng vi khuẩn.

2.2.3. Xác định khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Vibrio* spp. kết hợp đa loài

Thí nghiệm xác định khả năng tổ hợp được thực hiện trên 5 tổ hợp vi khuẩn khác nhau bao gồm ACV (*V. alginolyticus*, *V. cholerae* và *V. vulnificus*), ACP (*V. alginolyticus*, *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus*), AVP (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus*), CVP (*V. cholerae*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus*) và ACVP (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus*). Ở mỗi thí nghiệm với tổ hợp vi khuẩn có 5 nghiệm thức, lặp lại 3 lần, bao gồm 1 nghiệm thức đối chứng (không cảm nhiễm) và 4 nghiệm thức cảm nhiễm với tổ hợp vi khuẩn ở các mật độ từ 0,37; 0,4; 0,35; $0,29 \times 10^3 - 10^6$ CFU/mL tương ứng với từng tổ hợp ACV, ACP, AVP, CVP và ACVP. Tôm được bố trí trong hệ thống và cảm nhiễm tương tự như phương pháp trong cảm nhiễm đơn loài.

Theo dõi thí nghiệm: Các nghiệm thức được xi-phông đáy, thay nước và theo dõi các chỉ tiêu chất lượng nước mỗi ngày. Dấu hiệu bệnh lý, biểu hiện của tôm được quan sát liên tục trong 14 ngày. Tất cả tôm vừa mới chết hoặc có biểu hiện lơ ò, bơi lội kém linh hoạt được thu lấy để ghi nhận thời gian vi khuẩn gây bệnh, dấu hiệu biểu hiện bệnh, tỉ lệ tôm chết.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel, so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phép thử Duncan và phần mềm SPSS 20.0 với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 4 năm 2021 tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

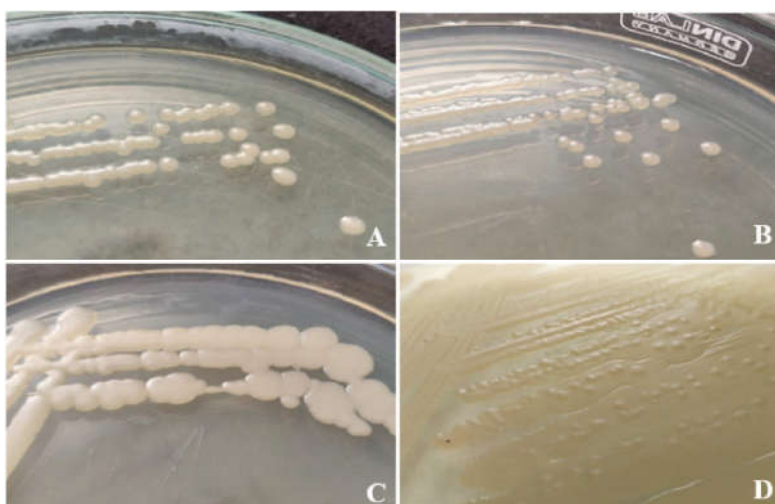
3.1. Kết quả

3.1.1. Phục hồi vi khuẩn

Kết quả phục hồi vi khuẩn cho thấy đều là vi khuẩn Gram âm, hình que, di động, có khả năng sinh ra catalase và oxidase. Chúng phát triển trên môi trường TCBS và TSA (+1,5% NaCl) sau khi ủ 24 giờ ở 28°C với những hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho từng loài vi khuẩn *Vibrio* spp. (Hình 1). Các đặc điểm từ các chủng vi khuẩn có sự tương đồng với

các đặc điểm chung của vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. cholera*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* được

phân lập, định danh từ nghiên cứu của Trương và cộng tác viên (2021).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các chủng *Vibrio* spp. trên môi trường TSA+

Ghi chú: (A) *V. alginolyticus* CM3IC1: vàng nhạt, tròn đều, rìa nhẵn, $d = 2 - 3$ mm; (B) *V. cholera* CM3HPTB1: xám trắng, tròn, rìa nhẵn, $d = 1 - 1,5$ mm; (C) *V. vulnificus* CM2HPA4: vàng đục, tròn rìa không đều, hơi nhớt, $d = 3 - 4$ mm và (D) *V. parahaemolyticus* BTIA1: vàng, tròn, rìa không đều, trượt.

3.1.2. Kết quả kiểm tra chất lượng nước

Một số chỉ tiêu chất lượng nước được theo dõi ở tất cả các thí nghiệm trong quá trình thực hiện cảm nhiễm. Trong đó, nhiệt độ dao động trong khoảng 26 - 30°C, pH ở mức 7,5 - 8,5, độ kiềm dao động từ 100 - 140 mg CaCO₃/L hàm lượng NH₃ dao động trong khoảng 0,009 - 0,01 mg/L (Bảng 1). Nhìn chung, các yếu tố môi trường luôn được duy trì ở mức thích hợp cho tôm nuôi và không có ảnh hưởng đến quá trình thí nghiệm.

Bảng 1. Chỉ tiêu chất lượng nước trong thí nghiệm cảm nhiễm

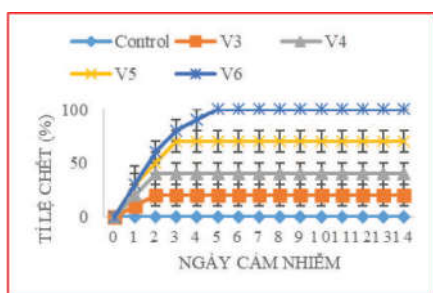
Chỉ tiêu môi trường	TN cảm nhiễm đơn loài	TN cảm nhiễm tổ hợp
Nhiệt độ (°C)	28 - 30	26 - 30
pH	7,5 - 8,5	7 - 8
NH ₃	0,01	0,009
Kiểm	110 - 140	100 - 125

3.1.3. Thí nghiệm xác định độc lực vi khuẩn *Vibrio* spp. cảm nhiễm đơn loài

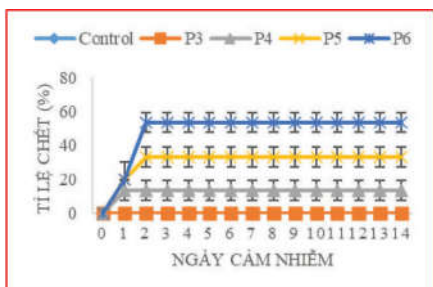
Sau khi phục hồi vi khuẩn được xác định độc lực bằng phương pháp tiêm với dãy nồng độ vi khuẩn từ 10³ - 10⁶ CFU/mL. Tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức đối chứng âm trong tất cả các thí nghiệm cảm

nh nhiễm là 100%, chứng tỏ hệ thống bố trí ổn định trong suốt quá trình bố trí thí nghiệm. Sau thời gian cảm nhiễm, giá trị độc lực và dấu hiệu bệnh lý ghi nhận có sự khác biệt tùy theo từng loài vi khuẩn được cảm nhiễm.

Trong thí nghiệm với *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus*, tôm đều chết ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn với các diễn biến khác nhau. Cảm nhiễm vi khuẩn *V. vulnificus* tôm bắt đầu chết sau 12 giờ ở tất cả các nghiệm thức, tăng liên tục trong 5 ngày sau cảm nhiễm ở nghiệm thức tiêm nồng độ vi khuẩn 10⁶ CFU/mL và trong 3 ngày ở các nghiệm thức khác, sau đó dừng chết đến ngày thứ 14. Kết thúc thí nghiệm, tôm chết 100% ở nghiệm thức tiêm vi khuẩn 10⁶ CFU/mL và giảm dần theo nồng độ vi khuẩn được tiêm với tỉ lệ 70 ± 10%, 40 ± 10% và 20 ± 10% tương ứng với mật độ vi khuẩn từ 10⁵ - 10³ CFU/mL. Nồng độ gây chết 50% (LD₅₀) của vi khuẩn *V. vulnificus* trong thí nghiệm là 1,5 × 10⁴ CFU/mL (Hình 2). Giá trị LD₅₀ ghi nhận là 2,7 × 10⁵ CFU/mL ở thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Trong đó, không ghi nhận tôm chết ở nghiệm thức tiêm nồng độ 10³ CFU/mL trong khi ở các nghiệm thức tiêm các nồng độ 10⁴ - 10⁶ tôm bắt đầu chết sau 18 giờ cảm nhiễm với tỉ lệ chết tương ứng là 13,3 ± 5,8%, 23,3 ± 5,8% và 53,3 ± 5,8% (Hình 3).

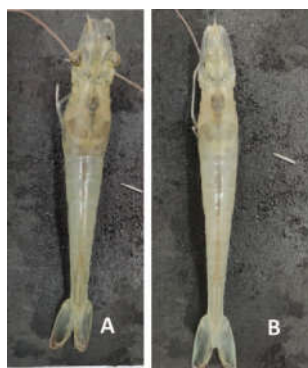


Hình 2. Tỷ lệ chết tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm vi khuẩn *V. vulnificus*



Hình 3. Tỷ lệ chết tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Ngược lại, *V. alginolyticus* và *V. cholerae* cảm nhiễm ở đây nồng độ từ 10^3 - 10^6 CFU/mL, không gây chết tôm trong suốt thời gian thí nghiệm, do đó chưa xác định được giá trị liều gây chết 50% (LD_{50}) của 2 loài vi khuẩn này. Kết quả bước đầu xác định LD_{50} *V. alginolyticus* và *V. cholerae* nằm trong khoảng giá trị lớn hơn 10^6 CFU/mL. Từ giá trị LD_{50} được xác định từ thí nghiệm trên *Vibrio* spp. phân lập từ tôm bệnh đường ruột, cho thấy độc lực cao nhất là vi khuẩn *V. vulnificus*, sau đó là *V. parahaemolyticus*.



Hình 4. Dấu hiệu bệnh lý tôm cảm nhiễm đơn các chủng *Vibrio* spp.

Ghi chú: A. Tôm cảm nhiễm *V. vulnificus* CM2HPA4 tôm nhạt màu, gan tụy vàng, ruột rỗng. B. Tôm nhiễm *V. parahaemolyticus* BTIA1 tôm nhạt màu, gan tụy trắng, teo, ruột rỗng.

Tôm biểu hiện bệnh lý ở tất cả các thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus* với một số dấu hiệu chung như đường tiêu hóa không liên tục hoặc ruột rỗng. Ở các thí nghiệm ghi nhận được biểu hiện của một số dấu hiệu đặc trưng cho từng chủng vi khuẩn như hiện tượng gan tụy sưng, nhạt màu, phân lỏng trên tôm cảm nhiễm *V. alginolyticus* và *V. cholerae*; biểu hiện nhạt màu, gan sưng to, mềm nhũn và có dịch trên tôm cảm nhiễm với *V. vulnificus* (Hình 4A) và dấu hiệu nhạt màu, gan tụy sưng to hoặc teo dai trên tôm cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (Hình 4B). Các nghiệm thức có mật độ vi khuẩn cảm nhiễm càng cao thì dấu hiệu bệnh lý càng rõ ràng.

3.1.4. Xác định sự tác động của các tổ hợp giữa các loài *Vibrio* spp. trên tôm thẻ chân trắng

Cùng với thí nghiệm xác định độc lực của các loài vi khuẩn, nghiên cứu cũng thực hiện tổ hợp các loài vi khuẩn với nhau nhằm xác định khả năng gây bệnh của các loài vi khuẩn này trong trường hợp bội nhiễm *Vibrio* spp. trên tôm thẻ chân trắng nuôi trong ao ngoài thực tế. Kết quả theo dõi trên các thí nghiệm cảm nhiễm với các tổ hợp vi khuẩn cho thấy, tôm đạt tỷ lệ sống 100% ở nghiệm thức đối chứng âm trong thời gian thí nghiệm và chết ở tất cả các nghiệm thức có cảm nhiễm vi khuẩn với khoảng thời gian bắt đầu chết, tỷ lệ chết khác nhau theo từng tổ hợp. Theo đó, tôm cảm nhiễm bắt đầu chết vào ngày thứ 8 sau cảm nhiễm ở tất cả nghiệm thức cảm nhiễm với các tổ hợp ACV, ACP, ACVP và cảm nhiễm tổ hợp AVP, CVP ở nồng độ 10^3 và 10^4 CFU/mL. Đối với các nồng độ 10^5 và 10^6 CFU/mL của 2 tổ hợp vi khuẩn này, tôm chết ở thời gian sớm hơn, sau 7 ngày ở tổ hợp AVP và 6 ngày ở tổ hợp CVP.

Sau 14 ngày, tỷ lệ chết của tôm cảm nhiễm đây nồng độ 10^3 - 10^6 CFU/mL với hỗn hợp ACVP là 6,7 - 10,3%, tổ hợp ACP với từ 20 - 26,7%, tổ hợp ACV từ 13,3 - 33,3%, tổ hợp AVP 13,3 - 43,3% và ở tổ hợp CVP 33,3 - 83,3%. Qua xử lý thống kê cho thấy, tỷ lệ chết có sự khác biệt giữa các nghiệm thức và tăng tỷ lệ thuận theo nồng độ vi khuẩn cảm nhiễm ở hầu hết các thí nghiệm. Tuy nhiên, chỉ riêng ở thí nghiệm với tổ hợp vi khuẩn ACVP không có sự khác biệt ($p > 0,05$), trong khi ở các thí nghiệm còn lại với tổ hợp ACP, ACP, AVP, CVP ghi nhận có sự khác biệt ($p < 0,05$) về tỷ lệ chết của tôm giữa các nghiệm thức, rõ rệt nhất ở hai nghiệm thức cảm nhiễm ở nồng độ 10^3 CFU/mL và 10^6 CFU/mL (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả xác định khả năng gây bệnh của các tổ hợp *Vibrio* spp. trên tôm thẻ chân trắng

Tổ hợp vi khuẩn	Nồng độ (CFU/mL)	Tỉ lệ chết (%)	Dấu hiệu bệnh lý
Đối chứng	0	0 ± 0,0 ^a	bình thường
<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> (ACV)	10 ³	13,3 ± 5,8 ^b	Gan tụy sưng, nhạt màu, thức ăn đường tiêu hóa không liên tục, phân lỏng hoặc phân trắng
	10 ⁴	13,3 ± 5,8 ^b	
	10 ⁵	26,7 ± 5,8 ^c	
	10 ⁶	33,3 ± 5,8 ^c	
<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahemolyticus</i> (ACP)	10 ³	10 ± 0,0 ^b	Gan tụy sưng, nhạt màu, thức ăn đường tiêu hóa không liên tục, phân lỏng hoặc phân trắng.
	10 ⁴	23,3 ± 5,8 ^c	
	10 ⁵	23,3 ± 5,8 ^c	
	10 ⁶	26,7 ± 5,8 ^c	
<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahemolyticus</i> (AVP)	10 ³	13,3 ± 5,8 ^b	Gan tụy sưng, nhạt màu, thức ăn đường tiêu hóa không liên tục hoặc rỗng ruột
	10 ⁴	23,3 ± 11,5 ^{bc}	
	10 ⁵	33,3 ± 10 ^{cd}	
	10 ⁶	43,3 ± 5,8 ^d	
<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahemolyticus</i> (CVP)	10 ³	33,3 ± 5,8 ^b	Gan tụy sưng, nhạt màu, thức ăn đường tiêu hóa không liên tục hoặc rỗng ruột
	10 ⁴	43,3 ± 5,8 ^b	
	10 ⁵	50 ± 5,8 ^b	
	10 ⁶	83,3 ± 5,8 ^c	
<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahemolyticus</i> (ACVP)	10 ³	6,7 ± 5,8 ^b	Gan tụy sưng, nhạt màu, thức ăn đường tiêu hóa không liên tục hoặc phân lỏng
	10 ⁴	6,7 ± 5,8 ^b	
	10 ⁵	10 ± 0,0 ^b	
	10 ⁶	10,3 ± 5,8 ^b	

Ghi chú: Các số trung bình có cùng chữ cái (mẫu tự) theo sau trong cùng một cột thì không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 5. Dấu hiệu bệnh lý tôm thí nghiệm cảm nhiễm tổ hợp *Vibrio* spp.

Ghi chú: (A&B) Gan tụy và đường ruột tôm thí nghiệm thức đối chứng, (C&D) Gan tụy và đường ruột tôm cảm nhiễm tổ hợp chủng CVP với gan tụy sưng và nhạt màu, phân lỏng, thức ăn đường tiêu hóa không liên tục, (E&F) Tôm và gan tụy tôm cảm nhiễm tổ hợp chủng ACV với gan tụy nhạt màu, sưng, đường ruột có màu trắng sữa.

Từ kết quả tỉ lệ chết ở các thí nghiệm, mức độ ảnh hưởng của các tổ hợp vi khuẩn *Vibrio* spp. đến tôm ở từng nồng độ cảm nhiễm cho thấy theo thự tự là ACVP < ACP < ACV < AVP < CVP. Trong đó, ta có thể thấy được ở thí nghiệm với tổ hợp 3 loài vi khuẩn, thí nghiệm với tổ hợp AC (*V. alginolyticus* và *V. cholerae*)

kết hợp với một đơn chủng khác là *V. vulnificus* hoặc *V. parahemolyticus* sẽ cho tỉ lệ chết thấp hơn so với cảm nhiễm tôm với tổ hợp VP (*V. vulnificus* và *V. parahemolyticus*) kết hợp với *V. alginolyticus* hoặc *V. cholerae*. Tuy nhiên, cảm nhiễm hỗn hợp bốn loại vi khuẩn này lại ít gây ảnh hưởng đến tôm cảm nhiễm.

Màu sắc tươi sáng, khối gan tụy bình thường, ruột đầy thức ăn, phản ứng nhạy với tiếng động trên tôm ở nghiệm thức đối chứng (Hình 5A & B). Dấu hiệu bệnh lý được ghi nhận khá sớm vào ngày thứ 3 ở các nghiệm thức cảm nhiễm tổ hợp vi khuẩn, các dấu hiệu bệnh lý chung biểu hiện như gan tụy nhạt màu, sưng to và đường ruột có đường thức ăn không liên tục. Các dấu hiệu trên gan tụy biểu hiện rõ nhất trên tôm cảm nhiễm với tổ hợp AVP và CVP. Bên cạnh đó, một số tôm cảm nhiễm tổ hợp AVP và CVP cũng biểu hiện rỗng ruột và dấu hiệu phân lỏng trên tôm cảm nhiễm tổ hợp ACV, ACP, ACVP (Hình 5C & D). Đặc biệt, trên tôm cảm nhiễm với tổ hợp vi khuẩn ACV và ACP, nghiệm cứu đã ghi nhận được dấu hiệu bệnh lý đường ruột tôm có màu trắng sữa tương tự với tôm bệnh phân trắng thu ngoài tự nhiên (Hình 5E & F).

3.2. Thảo luận

Bệnh gây ra do vi khuẩn *Vibrio* spp. hay “Vibriosis” là một trong những bệnh phổ biến và gây thiệt hại cho nghề nuôi tôm nói chung và nghề nuôi tôm nước lợ nói riêng với một số bệnh nguy hiểm được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Trong đó, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus* được xác định có liên quan đến các bệnh như hội chứng trên ấu trùng Zoea II, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, bệnh nhiễm trùng - hoại tử gan tụy, bệnh trên vỏ tôm, bệnh hoại tử đuôi và bệnh đỏ thân trên tôm nước lợ. Đây cũng là bốn loài thường thấy được phân lập từ đường ruột tôm bị bệnh phân trắng (Truong *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2015; Limsuwan, 2010).

Nồng độ gây chết trên tôm thẻ chân trắng của *V. alginolyticus* CM3IC1 được xác định là $> 10^6$ CFU/mL khi thực hiện bằng phương pháp tiêm, phù hợp với nghiên cứu của Hsieh và cộng tác viên (2008) và Chen và cộng tác viên (2015) khi nồng độ gây chết cảm nhiễm *V. alginolyticus* trên tôm thẻ chân trắng được ghi nhận trên các liều 10^5 - $5,6 \times 10^5$ CFU/g mà không ghi nhận được ở nồng độ thấp hơn. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong thí nghiệm cảm nhiễm với *V. cholerae* CM3HPTB1 với giá trị gây chết xác định nằm trong khoảng $> 10^6$ CFU/mL. Điều này cho thấy *V. cholerae* phân lập từ tôm bệnh đường ruột có giá trị độc lực thấp đối với tôm thẻ chân trắng giai đoạn thịt khi cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm. Trong khi đó, *V. cholerae* lại được ghi nhận có giá trị độc lực cao trên tôm thẻ chân trắng giai đoạn giai đoạn PL₁₅₋₂₀ khi thực hiện bằng phương pháp ngâm với giá trị LD₅₀ là $4,6 \times 10^4$ CFU/mL (Joseph *et al.*, 2015).

Tôm cảm nhiễm *V. alginolyticus* CM3IC1 và *V. cholerae* CM3HPTB1 có biểu hiện giống nhau về dấu hiệu bệnh lý như gan tụy sưng to, nhạt màu nguyên nhân do vi khuẩn làm phá vỡ lớp nền của ống gan tụy, giảm các không bào, gây mất cấu trúc, hoại tử tế bào biểu mô và hình thành nên các ổ viêm (Hannan *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2019). Bên cạnh đó, vi khuẩn tấn công cũng dẫn đến các tế bào biểu mô ruột bị hoại tử nghiêm trọng và sự tách biệt giữa tế bào biểu mô với màng tế bào nền trong cấu trúc đường ruột giữa của tôm. Các biến đổi trên rối loạn chức năng tiêu hóa và ảnh hưởng đến sức khỏe tôm nuôi dẫn đến tôm thường hoạt động yếu, lơ đờ, giảm hoặc bỏ ăn, thức ăn đường tiêu hóa thường không liên tục hoặc rỗng ruột (Gao *et al.*, 2019; Hannan *et al.*, 2019).

Giá trị LD₅₀ trên tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* BTIA1 trong nghiên cứu là $2,7 \times 10^5$ CFU/mL, có giá trị độc lực cao hơn so với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* S05 được phân lập từ tôm thẻ bị bệnh phân trắng tại Trung Quốc khi thực hiện bằng phương pháp bơm vi khuẩn ngược từ đường hậu môn (Wang *et al.*, 2020). Các biểu hiện bệnh lý trên tôm cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* BTIA1 trong nghiên cứu có sự tương đồng với thí nghiệm của Wang và cộng tác viên (2020) trên *V. parahaemolyticus* S05 với các dấu hiệu như ruột rỗng và gan tụy nhạt màu. Trong các trường hợp này, gan tụy tôm cảm nhiễm bị mất cấu trúc hình sao, các tế bào B, R, F giảm số lượng hoặc tiêu biến, lòng ống gan tụy mở rộng và độ dày của các tế bào biểu mô gan tụy. Bên cạnh đó, trên một số mẫu tôm cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* chủng BTIA1 ghi nhận gan tụy bị teo, tương tự như mô tả cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* BL2 phân lập từ tôm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh (2015). Đây là dấu hiệu cho thấy gan tụy tôm bị hoại tử, giảm các tế bào biểu mô, các tế bào bị thoái hóa, bong tróc và hình thành nên các ổ vi khuẩn được bao quanh bởi các tế bào máu. Ngoài ra, *V. parahaemolyticus* có thể gây ra các tổn thương cục bộ, đỏ thân và đỏ phụ bộ trên tôm thẻ chân trắng (Mastan and Begum, 2016).

V. vulnificus là loài vi khuẩn phổ biến thường xuất hiện nhiều ở các vùng cửa sông và vùng biển trên toàn thế giới. *V. vulnificus* gây hiện tượng đỏ thân trên tôm sú giai đoạn PL20 và gây chết sớm hàng loạt trên tôm càng xanh (*M. rosenbergii*) giai đoạn zoea và hậu ấu trùng. Giá trị LD₅₀ cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm trên tôm sú là $6,54 \times 10^3$ CFU/mL và theo

thứ tự là $1,16 \times 10^6$ CFU/mL và $1,45 \times 10^6$ CFU/mL tương ứng với hai giai đoạn tôm cảnh xanh (Li *et al.*, 2019; Alday *et al.*, 2002). Trên tôm thẻ chân trắng, các nghiên cứu về độc lực cũng như khả năng gây bệnh của loài vi khuẩn này vẫn còn nhiều hạn chế. Thí nghiệm của Mastan và Begum (2016) cảm nhiễm *V. vulnificus* phân lập từ tôm thẻ chân trắng bệnh phân trắng tại Andhra Pradesh, Ấn Độ tiêm với liều 10^5 CFU/g cho thấy, không ghi nhận được dấu hiệu bệnh lý nào trên tôm. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này *V. vulnificus* CM2HPA4 có giá trị độc lực cao nhất trong 4 loài vi khuẩn được phân lập từ tôm bệnh đường ruột với giá trị LD₅₀ là $1,6 \times 10^4$ CFU/mL và các đặc điểm bệnh học của *V. vulnificus* lên tôm thẻ chân trắng như gan tụy nhạt màu, đường thức ăn không liên tục hoặc rỗng ruột.

Các biểu hiện của bệnh phân trắng với đường ruột màu trắng sữa đặc trưng trên một số mẫu tôm cảm nhiễm tương tự tôm bệnh ngoài tự nhiên được ghi nhận trong thí nghiệm cảm nhiễm với tổ hợp vi khuẩn *Vibrio* của nghiên cứu ở các nghiệm thức kết hợp ACP (*V. alginolyticus* *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*) và ACV (*V. alginolyticus* *V. cholerae*, *V. vulnificus*). Từ đó, có thể nhận định về vai trò của *V. alginolyticus* và *V. cholerae* trong tổ hợp việc gây nên bệnh phân trắng trên tôm thẻ chân trắng tại Việt Nam, trong khi *V. cholerae* và *V. alginolyticus* đã được xác định tác nhân gây nên bệnh phân trắng trên tôm thẻ chân trắng tại Trung Quốc và tôm sú tại Sri Lanka (Kumara and Hettiarachchi, 2017; Cao *et al.*, 2015). Theo Poh Yong Thong (2016), sự xâm nhập của vi khuẩn kết hợp với sự bong tróc các vi nhung mao trên các ống gan tụy/trên thành ruột do độc tố tiết ra từ vi khuẩn có thể gây ra bệnh phân trắng, phù hợp với thực tế trên các mẫu tôm bệnh phân trắng mật độ vi khuẩn tổng và *Vibrio* spp. trong máu, gan tụy và ruột luôn cao hơn có ý nghĩa so với tôm khỏe ở các ao nuôi (Kumara and Hettiarachchi, 2017).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Giá trị LD₅₀ của *V. vulnificus* CM2HPA4 và *V. parahaemolyticus* BTIA1 trên tôm thẻ chân trắng lần lượt là $1,5 \times 10^4$ và $2,7 \times 10^5$ CFU/mL. Tôm thí nghiệm cảm nhiễm đơn loài không biểu hiện dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh phân trắng, tuy nhiên cảm nhiễm *V. alginolyticus* và *V. cholerae* biểu hiện dấu hiệu phân lỏng, gan tụy sưng, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus* ảnh hưởng chủ

yếu lên gan tụy gây nhạt màu sùng to, mềm nhũn có dịch hoặc teo lại.

Tôm cảm nhiễm tổ hợp *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* và tổ hợp *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* biểu hiện dấu hiệu bệnh lý tương tự tôm bệnh phân trắng trong ao nuôi ngoài tự nhiên.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu về các yếu tố liên quan đến độc lực của các chủng vi khuẩn trong tổ hợp gây nên dấu hiệu phân trắng trên tôm thẻ chân trắng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Hà, Đào Xuân Trường và Lê Xuân Khoa, 2011. Biến đổi mô bệnh học ở gan tụy tôm sú nuôi bị bệnh phân trắng. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 18 (2): 74-80.
- Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2015. Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 39: 99-107.
- Tổng cục Thủy sản, 2021. *Tăng cường chỉ đạo phát triển nuôi tôm nước lợ năm 2021*. Trang thông tin điện tử Tổng cục Thủy sản, ngày truy cập 01/09/2021. Địa chỉ: <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/tang-cuong-chi-dao-phat-trien-nuoi-tom-nuoc-lo-nam-2021>.
- Alday-Sanz, V., Roque, A. and Turnbull, J.F., 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48 (2): 91-99.
- Cao H., Wen L., He S., Lu L., Yang X. and Chen B., 2015. *Vibrio cholerae*: a causal agent for the white feces syndrome in freshwater cultured whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). *The Israeli Journal of Aquaculture - BAMIDGEH*, 67: 1-7.
- Chen, Y.Y., Chen, J.C., Tseng, K.C., Lin, Y.C. and Huang, C.L., 2015. Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. *Fish and Shellfish Immunology*, 46: 192-199.
- Gao, X., Miao, Z., Li, X., Chen, N., Gu, W., Liu, X., Yang, H., Wei, W. and Zhang, X., 2019. Pathogenicity of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* and its induced immune response in *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 92: 300-307.
- Hannan, M.D.A., Rahman M.D.M., Mondal M.D.N., Chandra, D.S., Chowdhury, G. and Islam, M.D.T.,

2019. Molecular Identification of *Vibrio alginolyticus* Causing Vibriosis in Shrimp and Its Herbal Remedy. *Polish Journal of Microbiology*, 68 (4): 429-438.
- Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Lia, Y.C., Hsieh, P.S., Hu C.H. and Kuo, C.M., 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 275 (1-4): 335-341.
- Joseph, T.C., Murugadas, V., Reghunathan, D., Shaheer, P., Akhlnath, P.G. and Lalitha, K.V., 2015. Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* O139 associated with mass mortality in *Penaeus monodon* and experimental challenge in postlarvae of three species of shrimp. *Aquaculture*, 442: 44-47.
- Kumara, K.R.P.S. and Hettiarachchim, M., 2017. White faeces syndrome caused by *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio fluvialis* in shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798) - multimodal strategy to control the syndrome in Sri Lankan grow-out ponds. *Asian Fisheries Science*, 30: 245-261.
- Li, X., Zhou, Y., Jiang, Q., Yang, H., Pi, D., Liu X., Gao, X., Chen, N. and Zhang, X., 2019. Virulence properties of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased zoea of freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Microbial Pathogenesis*, 127: 166-171.
- Limsuwan, C., 2010. White Faeces Disease in Thailand. *Boletines nicovita magazine*, 36 (1): 2-4.
- Mastan, S.A. and Begum, S.K.A., 2016. Vibriosis in farm reared white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in Andhra Pradesh-natural occurrence and artificial challenge. *International Journal of Applied Sciences Biotechnology*, 4 (2): 217-222.
- Reed L.J. and Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), May 1938: 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Sriurairatana, S., Boonyawiwat, V., Gangnonngiw, W., Laosutthipong, C., Hiranchan, J. and Flegel, T.W., 2014. White feces syndrome of shrimp arises from transformation, sloughing and aggregation of hepatopancreatic microvilli into vermiform bodies superficially resembling gregarines. *PLOS ONE*, 9 (6): e99170.
- Tang, K.F.J., Han, J.E., Aranguren, L.F., White-Noble, B., Schmidt, M.M., Piamsomboon, P., Risdiana, E., Hanggono, B., 2016. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* (2016), 140: 1-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.004>
- Thong Poh Yong, 2016. White faeces disease in shrimp. *AQUA Culture Asia Pacific Magazine*, January/February 2016: 8-11.
- Ut, T.M., Uyen D.T.T. and Dung T.T., 2021. Antimicrobial activity of herbal extracts against *Vibrio* spp. bacteria isolated from white feces syndrome on white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in some provinces in the Mekong Delta. *Can Tho University Journal of Science*, 13 (2): 61-68.
- Wang, H., Wan, X., Xie, G., Dong, Wang, X. and Huang, J., 2020. Insights into the histopathology and microbiome of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, suffering from white feces syndrome. *Aquaculture*, 527: 735447.

Pathogenicity determination of *Vibrio* spp. causing white feces disease on white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in some provinces of the Mekong Delta

Truong Minh Ut, Le Minh Khoi, Nguyen Trong Nghia, Ly Thị Ngọc Duyen, Tu Thanh Dung

Abstract

The purpose of this study was to determine the pathogenicity of 4 species of *Vibrio alginolyticus* (A), *V. cholerae* (C), *V. vulnificus* (V) and *V. parahaemolyticus* (P) isolated from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with white feces disease in some provinces of the Mekong Delta. The results of the single-species challenge test identified the 50% lethality (LD_{50}) concentration of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* was 1.5×10^4 CFU/mL and 2.7×10^5 CFU/mL, respectively. In the experiment combined challenge of *Vibrio* spp., the mortality of shrimp was recorded in the order ACVP < ACP < ACV < AVP < AVP at all treatments. In particular, the challenged shrimp at the experiment of combination of *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* (ACV) and *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* (ACP) showed clinical signs of white feces disease similar to those observed from naturally infected shrimp at farms.

Keywords: White-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Vibrio* spp., white feces disease

Ngày nhận bài: 02/8/2021
Ngày phản biện: 19/8/2021

Người phản biện: PGS.TS. Đặng Thị Lụa
Ngày duyệt đăng: 30/8/2021